



Wirkstoffforschung Hot Paper



Antiprotozoische Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von synthetischen Leucinostatin-Derivaten und Aufklärung ihres Wirkprinzips

Michael Brand, Lei Wang, Stefano Agnello, Silvia Gazzola, Flavio M. Gall, Luka Raguž, Marcel Kaiser, Remo S. Schmidt, Amélie Ritschl, Jennifer Jelk, Andrew Hemphill, Pascal Mäser, Peter Bütikofer, Michael Adams* und Rainer Riedl*

Abstract: Leucinostatin A ist eine der potentesten antiprotozoischen Verbindungen, die jemals beschrieben wurden, aber bisher war wenig über die Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) bekannt. *Trypanosoma brucei* wurde als Protozoen-Modellorganismus verwendet, um synthetisch modifizierte Derivate zu testen. Dabei wurden die vereinfachten, aber gleichermaßen aktiven Verbindungen **2** (ZHAWOC6025) und **4** (ZHAWOC6027) identifiziert. Anschließend wurden Modifikationen in allen Teilen des Moleküls durchgeführt, um ein besseres SAR-Verständnis zu erlangen. Die antiprotozoische SAR stimmte mit der SAR in Phospholipid-Liposomen überein, wobei die Membranintegrität, das Durchlässigkeitsverhalten und die Dynamik untersucht wurden. Die antiprotozoale Wirkung der natürlichen und synthetischen Leucinostatine liegt in der Destabilisierung der inneren Mitochondrienmembran, wie durch Ultrastrukturanalyse, Elektronenmikroskopie und Mitochondrienfärbung gezeigt wurde. Eine subletale Langzeitexposition von *T. brucei* (200 Passagen) und ein siRNA-Screening von 12'000 Mutanten zeigten keine Anzeichen einer Resistenzentwicklung gegenüber den synthetischen Derivaten.

Einleitung

Leucinostatine sind antimikrobielle Peptide (AMP) aus dem Pilz *Purpureocillium lilacinum* und gehören zu den potentesten jemals entdeckten antiprotozoischen Wirkstoffen. Einige von ihnen gehören zu den toxischsten oralen Mykotoxinen. Der Begriff Leucinostatin wurde 1973 für eine aus einer Pilzfermentationsbrühe isolierte Substanz geprägt, die

mehrere Leucine in der Struktur aufwies. Die endgültige Struktur konnte damals noch nicht geklärt werden.^[1] 1982 wiesen Mori et al. nach, dass das ursprüngliche Leucinostatin^[1] in Wirklichkeit ein Gemisch aus mehreren ähnlichen Verbindungen war, und ermittelten die Struktur der Hauptkomponente Leucinostatin A (**1a**) durch Massenspektrometrie, NMR, IR und Abbaustudien.

Die Verbindung besteht aus neun α -Aminosäuren, darunter *cis*-4-Methyl-L-Prolin, (2*S*)-Amino-(6*R*)-Hydroxy-(4*S*)-methyl-8-oxodecansäure (AHMOD), Hydroxyleucin und 2-Aminoisobuttersäure (Aib) sowie einer Fettsäure mit sieben Kohlenstoffatomen am N-Terminus (Abbildung 1).^[2]

Ein Jahr später publizierte dieselbe Gruppe die Struktur des demethylierten Derivats Leucinostatin B (**1b**).^[3] 1989 wurde die Kristallstruktur von Leucinostatin A ermittelt und die α -helikale Konformation bestätigt.^[4] Mit dem Aufkommen der Tandem-Massenspektrometrie konnten mehr als 20 Leucinostatin A-Derivate mit Demethylierung/Oxidation am N-terminalen Dimethylamin, Methylprolin und Deletionen oder Oxidation der AHMOD-Seitenkette entdeckt und in alphabetischer Reihenfolge benannt werden.^[5,6] Die Totalsynthese von Leucinostatin A (**1a**) wurde von Abe et al. (2017) erfolgreich durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Konfiguration der zuvor angenommenen Chiralität der AHMOD-Seitenkettenhydroxylgruppe falsch war.^[7] Der Biosyntheseweg wurde untersucht, und die an der Biosynthese beteiligten Gene, die spezifisch für *P. lilacinum* und *Tolypocladium inflatum ophioglossoides* sind, wurden identifiziert.^[8]

[*] Dr. M. Brand, Dr. S. Agnello, Dr. S. Gazzola, F. M. Gall, L. Raguž, Prof. Dr. R. Riedl
Institut für Chemie und Biotechnologie, Fachstelle Pharmazeutische Wirkstoffforschung und Arzneimittelentwicklung, Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW)
Einsiedlerstrasse 31, 8820 Wädenswil (Schweiz)
E-Mail: rainer.riedl@zhaw.ch

Dr. M. Kaiser, Dr. R. S. Schmidt, A. Ritschl, Prof. Dr. P. Mäser
Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut
Socinstrasse 57, 4051 Basel (Schweiz),
und
University of Basel
Petersplatz 1, 4001 Basel (Schweiz)

Dr. L. Wang, J. Jelk, Prof. Dr. P. Bütikofer
Institut für Biochemie und Molekulare Medizin, Universität Bern
Bühlstrasse 28, 3012 Bern (Schweiz)

Prof. Dr. A. Hemphill
Institut für Parasitologie, Vetsuisse Fakultät, Universität Bern
Länggass-Strasse 122, 3012 Bern (Schweiz)

Dr. M. Adams
Bacoba AG
Elisabethenstrasse 15, 4051 Basel (Schweiz)
E-Mail: adams@bacoba.ch

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummern (ORCID) der Autoren sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.202102153> zu finden.

© 2021 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

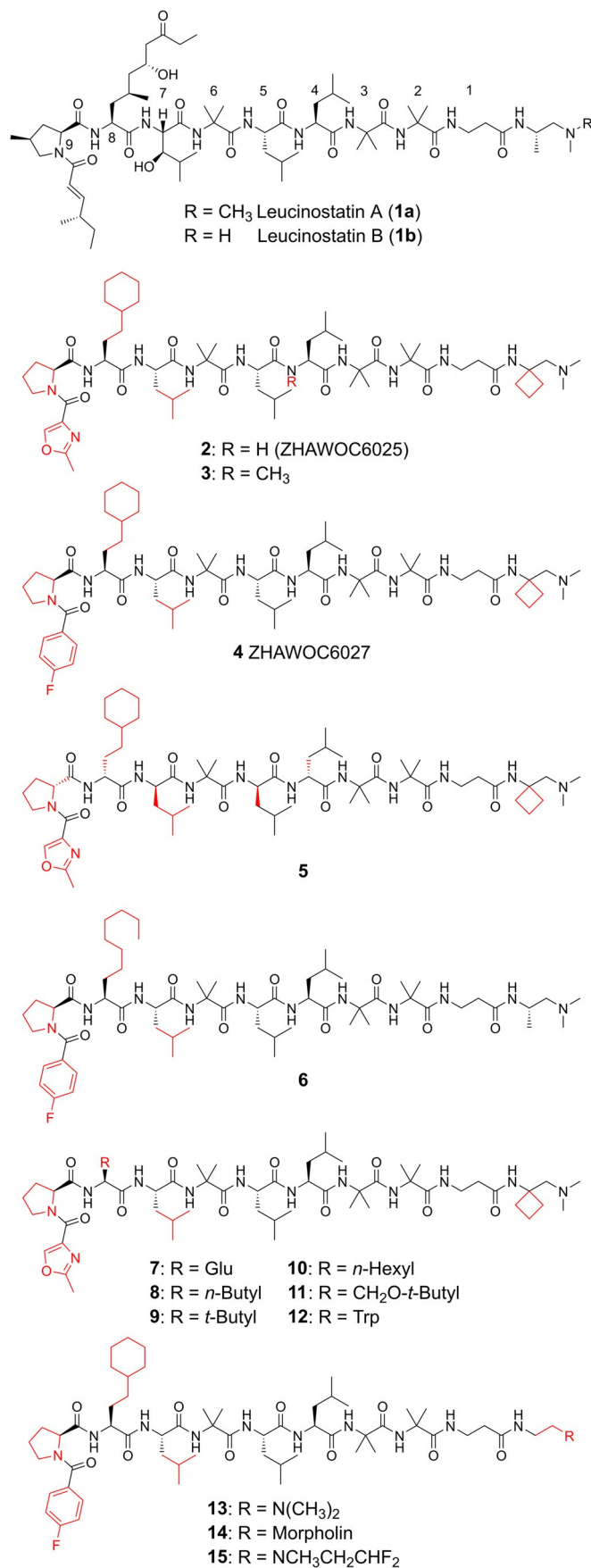


Abbildung 1. Strukturoptimierung des Naturstoffs Leucinostatin A zu den vereinfachten Derivaten. In rot sind die Veränderungen des Naturstoffs hervorgehoben.

Seit der bahnbrechenden Arbeit von Arai et al., deren neues Antibiotikum Leucinostatin aus einer Mischung von Leucinostatin A und B bestand,^[1] hat sich gezeigt, dass Leucinostatine a) die Proliferation vieler verschiedener Organismen hemmen und b) sehr toxisch sind. Leucinostatine wurden gegen 21 Pathogene in Pilzen (Minimale Hemmkonzentrationen = MICs: 10–25 μ M) und gram-positive Bakterien (2.5–100 μ M) getestet. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Leucinostatine bei Mäusen hochtoxisch mit einem intraperitonealen (ip) LD₅₀ von 1.6 mg kg⁻¹ sind. Mikami et al. zeigten, dass die ip-LD₅₀ der aufgereinigten Leucinostatine A (**1a**) und B (**1b**) jeweils 1.8 mg kg⁻¹ und die orale LD₅₀ 5.4 mg kg⁻¹ bzw. 6.3 mg kg⁻¹ betragen, und stellten fest, dass diese «zu den giftigsten Mykotoxinen wie T-2-Toxin, Fusarenon-X und Aflatoxine gehören».^[9] Andere Forscher haben die akute Toxizität bestätigt, darunter Ricci et al., deren Leucinostatin A (**1a**) bei Mäusen eine ip-LD₅₀ von 1.1 mg kg⁻¹ zeigte.^[10]

Diese starke Toxizität hat den therapeutischen Einsatz von Leucinostatinen verhindert. Obwohl Leucinostatine zuerst als Antibiotika entdeckt wurden,^[1] könnte das Erreichen der notwendigen systemischen Wirkkonzentrationen (MICs) zur Eliminierung von bakteriellen oder pilzartigen Pathogenen in Säugetieren die tödliche Dosis überschreiten.

Nur eine Gruppe von Erregern, die pathogenen Protozoen, erwies sich als überempfindlich gegenüber Leucinostatinen. Otoguro et al. zeigten erstmals, dass Leucinostatin A (**1a**) *Plasmodium falciparum* (den Erreger der Malaria tropica) mit einem IC₅₀ von 0.4–0.9 nM und *Trypanosoma brucei* (den Erreger der Humanen Afrikanischen Trypanosomiasis (HAT)) mit einem IC₅₀ von 2.8 nM inhibieren.^[11] Im akuten *T. brucei* HAT-Mausmodell zeigte Leucinostatin B (**1b**) kurative Effekte bei einer Dosis von 4 \times 0.3 mg kg⁻¹ ip und 4 \times 1.0 mg kg⁻¹ ip, während Leucinostatin A (**1a**) (das aufgrund der Toxizität nicht höher getestet wurde) bei 4 \times 0.3 mg kg⁻¹ ip keine Wirkung zeigte.^[12] In einem anderen akuten HAT-Mausmodell wurde eine von vier Mäusen mit Leucinostatin B bei 4 \times 1.0 mg kg⁻¹ ip geheilt und die mittlere Überlebensdauer wurde von 11.3 Tagen auf 28 Tage verlängert, während bei 4 \times 0.3 mg kg⁻¹ ip keine Mäuse geheilt wurden, aber die mittlere Überlebensdauer im Vergleich zu unbehandelten Mäusen leicht erhöht war.^[12]

Das Wirkprinzip der Leucinostatine wurde mit ihrer allgemeinen destabilisierenden Wirkung auf biologische Membranen sowohl in künstlichen Membransystemen als auch in lebenden Zellen erklärt,^[13–16] was die unspezifische Toxizität gegenüber Bakterien, Pilzen und Säugetierzellen im μ M-Bereich erklären könnte. Leucinostatine sind klassische Peptidantibiotika, die einen hohen Anteil an nicht proteinogenen Aminosäuren besitzen, welche zur Bildung von 3₁₀-helikalen Strukturen neigen^[17] und hydrophobe Reste enthalten.^[18] Leucinostatine gehören ebenfalls zur Unterklasse der AHMOD-haltigen Aminolipopeptide.^[18]

Über die strukturelle Voraussetzung für die antiprotozoische Aktivität der Leucinostatine und deren Wirkprinzip ist wenig bekannt. Vertuani et al. stellten acht Leucinostatin A-Homologe durch Reduktion, Dehydratisierung und Acetylierung der 4-Methylhex-2-ensäure-, AHMOD- und Hydroxy-L-Leucin-Reste her und untersuchten sie auf ihre an-

tibakterielle Aktivität.^[19] Diese Modifikationen führten nicht zu einer signifikanten Veränderung der antibakteriellen Aktivität und hatten auch keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur. Abe et al. führten ein Alanin-Scan durch und zeigten eine SAR auf Tumorzellen und Tumor-Stroma-Interaktion.^[20] Sie berichteten, dass die Acylgruppe am N-Terminus essentiell für die biologische Aktivität ist. Substitution der ungesättigten Acylkette durch eine Acetylgruppe führte zu einer 1000-fachen Abnahme der Aktivität. Des Weiteren zeigte das Alanin-Scanning, dass nur die Substitution von Aib-2 toleriert wurde, während die Veränderungen an den Aminosäuren Aib-3, Leu-5 und AHMOD-8 die Aktivität um eine Größenordnung reduzierten. Momose et al. zeigten, dass Leucinostatin Y mit einer Carbonsäure anstelle eines terminalen Amins weit weniger aktiv gegen Bakterien, Pilze und Krebszellen war als Leucinostatin A (**1a**).^[21] Umfassende Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) wurden jedoch nicht durchgeführt, und dringende Fragen blieben unbeantwortet. Hier präsentieren wir die erste umfassende Struktur-Wirkungs-Beziehung von Leucinostatin-Derivaten, bestimmen die strukturellen Voraussetzungen für die in vitro Antiprotozoen-Aktivität und optimieren die Selektivität der Moleküle.

Ergebnisse und Diskussion

Unser Ziel war es, die komplexe Struktur von Leucinostatin A (**1a**) zu vereinfachen und gleichzeitig die Wirksamkeit auf *T. b. rhodesiense* zu erhalten. Die Synthesestrategie basierte auf der mikrowellenunterstützten Festphasen-Peptidsynthese (SPPS), gefolgt von einer finalen Amidkopplung des 9-mer- Carbonsäurepeptids mit dem terminalen Amin in der Flüssigphase (Schema S1). Im Verlauf der Studie konnte das antiprotozoische Pharmakophor durch phänotypische in vitro-Assays nachverfolgt werden, und es wurde ermittelt, welche Molekülgruppen für die antiprotozoische Aktivität verantwortlich sind. Dies führte zu einem umfassenden Verständnis der Struktur-Aktivitäts-Beziehung.

Das Ersetzen des Hydroxyleucins an Position 7 durch ein einfaches und kommerziell günstiges Leucin wurde toleriert und hatte keinen negativen Einfluss auf die biologische Aktivität. Der Michael-Akzeptor wurde entweder durch 4-Fluorbenzoesäure oder ein Oxazol ersetzt. Der Dimethylamin-ethylenamid-Linker (**6**) am C-Terminus wurde mit einem Cyclobutylamin funktionalisiert, weil davon ausgegangen wurde, dass dies die metabolische Stabilität erhöht und kaum Auswirkungen auf die antiprotozoische Aktivität von *T. b. rhodesiense* hat. Die Seitenkette muss nicht zwingend eine AHMOD-Gruppe sein. Die Ethyl-cyclohexyl- oder *n*-Octyl-Seitenketten führten in den potentesten Derivaten **2**, **4** und **6** zu sub-nanomolaren Aktivitäten, welche vergleichbar mit dem Naturstoff Leucinostatin A sind (Tabelle 1). Diese Modifikationen ergaben nicht nur dieselbe Aktivität gegen *T. brucei*, sondern erhöhten auch den Selektivitätsindex um das 3- bis 5-fache. Die Hydrophobizität dieser Seitenkette ist essentiell, da Modifikationen, wie der Austausch durch Glutaminsäure (**7**) oder die kürzere aliphatische *n*-Butylkette (**8**), die in vitro-Potenz verringern. Das *n*-Hexylanalogon (**10**)

Tabelle 1: Aktivität von Leucinostatin A und seiner Derivate auf *T. b. rhodesiense* sowie die Zytotoxizität auf L6-Zellen und der berechnete Selektivitätsindex (SI). Die Leucinostatin-Derivate werden mit den Wirkstoffen Melarsoprol, Pentamidin und Suramin verglichen.

Verbindung	<i>T. b. rhod</i> [nM]	Zytotox L6 [nM]	SI
Leucinostatin A (1a)	0.25 (0.17–0.36) ^[a]	259 (97–691) ^[b]	1036
2	0.76 (0.63–0.91) ^[d]	3654 (3070–4350) ^[e]	4808
3	361 (282–461) ^[a]	> 8449 ^[a]	> 23
4	0.39 (0.35–0.43) ^[c]	1563 (1322–1848) ^[c]	4007
5	1.5 (1.1–2.1) ^[a]	5419 (4804–6113) ^[a]	3613
6	0.24 (0.20–0.28) ^[c]	885 (320–2451) ^[c]	3848
7	> 3200 ^[a]	> 8565 ^[a]	NA
8	6.5 (5.0–8.6) ^[a]	> 8750 ^[a]	> 1346
9	4.1 (3.1–5.5) ^[a]	> 8981 ^[a]	> 2190
10	0.85 (0.65–1.1) ^[b]	5138 (3953–6677) ^[a]	6045
11	3.9 (2.2–6.8) ^[a]	> 8749 ^[a]	> 2243
12	1.3 (0.6–3.0) ^[a]	7101 (5284–9543) ^[a]	5462
13	3.9 (2.8–5.6) ^[a]	6608 (4987–8755) ^[a]	1694
14	72 (52–99) ^[a]	7169 (5187–9909) ^[a]	100
15	398 (286–553) ^[a]	6731 (5597–8095) ^[a]	17
Melarsoprol	5.8 (4.8–7.1) ^[c]	24220 (15900–36700) ^[b]	> 4000
Pentamidin	1.8 (1.4–2.5) ^[c]	7600 (5900–9900) ^[b]	> 4000
Suramin	35 (28–44) ^[c]	> 100000 ^[b]	> 2800

NA = nicht anwendbar; [a] *n* = 2; [b] *n* = 3; [c] *n* = 4; [d] *n* = 9, [e] *n* = 8.

wies immer noch eine vergleichbare Potenz wie **2** auf. Die Modifikation dieser Aminosäure hat im Vergleich zur kürzlich veröffentlichten Arbeit von Abe et al. auf Krebszellen einen viel größeren Einfluss auf die Parasiten.^[20] Das Peptid **5**, das aus unnatürlichen D-Aminosäuren aufgebaut ist, zeigte

eine ähnliche Aktivität gegen *T. b. rhodesiense* wie **2** mit einem IC_{50} von 1.5 nM. Dies bedeutet, dass sowohl die links- als auch die rechtsdrehende Helix aktiv sind, was darauf hindeutet, dass diese Verbindungsklasse nicht an ein Protein-Target bindet. Die am Leucin-Amid an der Position vier des Peptid-Grundgerüsts *N*-methylierte Verbindung **3** führte zu einer 500-fachen Aktivitätsverringerung. Studien am Dimethylamin des C-Terminus ergaben, dass die Verminderung der Basizität des Amins durch Einführung eines σ -Akzeptors^[22] entweder mit einem Morpholin (**14**) oder einem Difluorethylmethylamin (**15**) die Potenz reduzierte. Die experimentell ermittelten pK_a -Werte der Dimethylamine (**4** und **13**) betrugen 7.3, das Morpholin (**14**) hatte einen pK_a von 5.2 und das Difluorethylmethylamin (**15**) einen pK_a unter 3.5.

Da diese Verbindungen die gleiche Zytotoxizität (7 μ M) aufwiesen, ist klar, dass die Erhöhung der Basizität diese Verbindungen von einer eher zytotoxischen Verbindung (**15**, Selektivitätsindex (SI) 17) zu einer hochselektiven Verbindung (**13**, SI 1694) verändert. Zusammenfassend wurde eine synthetische, besser zugängliche Leitverbindung mit äquipotenter Aktivität auf *T. b. rhodesiense*, aber reduzierter Zytotoxizität im Vergleich zum Naturstoff erhalten. Im Vergleich zu den derzeit verfügbaren Wirkstoffen sind diese synthetischen Derivate in Bezug auf ihre antitrypanosomale Potenz überlegen (Tabelle 1). Um weitere Erkenntnisse über die modifizierten Verbindungen zu gewinnen, wurde eine Analyse der Sekundärstruktur mittels Zirkulardichroismus-(CD)-Spektrometrie von Leucinostatin A (**1a**), **2**, **3**, **4**, **5** und **7** durchgeführt.

Alle Leucinostatin-Derivate zeigten helikalen Charakter, mit Ausnahme der *N*-methylierten Verbindung **3** (SI-Kapitel 3.1), was eindeutig darauf hinweist, dass die Helix ein wichtiges Merkmal für die antiprotozoische Aktivität ist. Dies zeigt, dass die Methylierung des Leucinamides die Helixbildung verhindert und somit zu einer starken Reduktion der antiparasitären Aktivität führt. Der helikale Charakter von **4** wurde durch NMR-NOE-Experimente bestätigt (Abbildung S1). Zusätzlich zeigte die Kinetik des Deuterium-Austausches der Rückgrat-Amide von **4** in CD_3OD , dass die Rückgrat-Amid-Protonen 2 bis 4 mit einer $t_{1/2} > 1$ Stunde bestehen bleiben, wobei **2** die längste Halbwertszeit von etwa 12.5 Stunden aufweist (Abbildung S2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Helix-bildendes Rückgrat, das basische terminale Amin und die hydrophobe Seitenkette für die biologische Aktivität entscheidend sind. Da lineare Peptide bekanntermaßen schnell metabolisiert werden, wurde die mikrosomale Stabilität gemessen. Die beiden Leitverbindungen **2** und **4** zeigten eine sehr vielversprechende mikrosomale Stabilität, insbesondere Verbindung **4** (> 80 % Wiederfindungsrate nach 40 Minuten, SI-Kapitel 3.5).

Studien zu den morphologischen und zellulären Wirkungen der Leucinostatin-Derivate wurden an *T. b. brucei* durchgeführt, einer Unterart von *T. brucei* und Erreger von Nagana, einer weit verbreiteten Rinderkrankheit in Afrika südlich der Sahara. Daher war es notwendig, die hemmenden Wirkungen der experimentellen Verbindungen auch auf *T. b. brucei* nachzuweisen. Die Aktivitäten von Leucinostatin A (**1a**) (0.4 nM), **2** (6.4 nM), **4** (3.6 nM) und **7** (> 1000 nM)

waren vergleichbar mit den Werten, die gegen *T. b. rhodesiense* gemessen wurden.

Bestätigung der In-vivo-Wirksamkeit

Die Verbindungen **2** (intraperitoneal (ip) 3 mg kg⁻¹ zweimal täglich (bid) für 4 Tage und oral (po) 30 mg kg⁻¹ einmal täglich (qd) für 4 Tage) und **4** (ip 3 mg kg⁻¹ bid 2 Tage) wurden auf ihre In-vivo-Wirksamkeit anhand des *T. b. brucei* (STIB795) akuten NMRI-Mausmodells getestet. Die Mäuse waren nach der Behandlung mit **2** (für 4 Tage) und **4** (für 2 Tage) frei von Parasiten (< 10⁴ Parasiten mL⁻¹). Die Überlebensrate der Mäuse war im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen verlängert (Abbildung 2). Interessanterweise war **2** (po 30 mg kg⁻¹ qd 4 Tage) auch bei oraler Verabreichung wirksam.

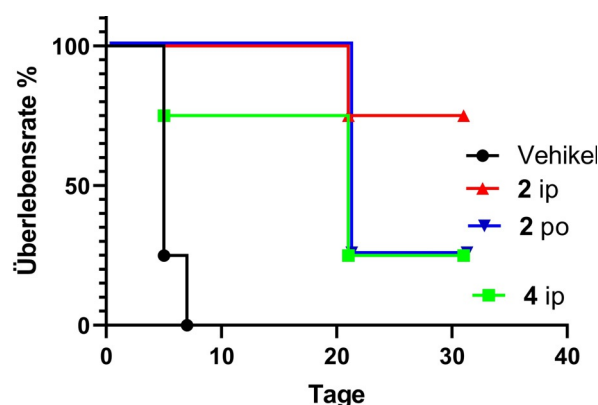


Abbildung 2. Kaplan-Meier-Darstellung des in vivo Experiments im *T. b. brucei* (STIB795) akuten NMRI-Mausmodell, behandelt mit Vehikel, **2** (ip und po) und **4** (ip). $n = 4$.

Wirkmechanismus

Frühere Studien haben gezeigt, dass Leucinostatin A (**1a**) als Ionophor auf isolierte Mitochondrien- und Chloroplastenpräparate wirken kann^[13–15] und die Membranpermeabilität von Zellen und künstlichen Membranen erhöht, indem es den Transport von ein- und zweiwertigen Kationen erleichtert.^[14] Darüber hinaus unterlag Leucinostatin A in Modell-Liposomen einer konzentrationsabhängigen Selbstaggregation in der Lipiddoppelschicht, wodurch der Lipidphasenübergang und die Membranfluidität beeinflusst und die Bildung von Membranporen verursacht wurden.^[15] Ähnliche Beobachtungen wurden für andere kationische antimikrobielle Peptide wie Melittin und Magainin gemacht, die Membranschäden verursachen, indem sie sich in Lipiddoppelschichten einfügen und temporäre oder stabile Poren bilden.^[23,24] Solche Poren können es Membranlipiden ermöglichen, frei von einer Seite der Doppelmembran zur anderen zu diffundieren, und kleinen hydrophilen Molekülen, die Membran zu durchdringen.

Um zu untersuchen, ob die in der vorliegenden Studie synthetisierten Leucinostatin-Derivate in der Lage sind, eine Durchmischung zwischen den Membranschichten von

Phospholipiden zu induzieren, wurden die Peptide zu Liposomen aus Eiphasphatidylcholin (PC), Eiphasphatidylglycerin (PG) und Spuren von [^3H]-markiertem Phosphatidyl-inositol ([^3H]PI), welches durch Behandlung mit PI-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) hydrolysiert wird, zugegeben. In Kontroll-Liposomen sollte die Behandlung mit PI-PLC zu einer Hydrolyse von etwa 50 % des [^3H]PI führen, d.h. dem Anteil von [^3H]PI, der im äußeren Teil der Doppelmembran vorliegt (Abbildung 3a). Im Gegensatz dazu sollte, wenn Leucinostatine eine Durchmischung zwischen den Membranschichten von Phospholipiden induzieren, das gesamte [^3H]PI nach Zugabe der Peptide zu den Liposomen für die PI-PLC verfügbar sein (Abbildung 3a).^[25] Das Ausmaß der [^3H]PI-Hydrolyse stieg von 50 % in Kontroll-Liposomen auf >80 % in Liposomen nach Zugabe steigender

Mengen der Peptide **1a**, **2** oder **4** (Abbildung 3b). Diese Ergebnisse sind konsistent mit einer Peptid-induzierten Translokation von [^3H]PI von der inneren zur äußeren Doppelmembran der Liposomen. Im Gegensatz dazu wurde keine Umverteilung von [^3H]PI nach Zugabe des nicht-antiprotozoischen Peptids **7** zu den Liposomen beobachtet (Abbildung 3b).

Zusätzlich wurde die Bildung von Membranporen unter Verwendung von Liposomen, die eingeschlossene NBD-Glucose enthalten, untersucht. Kommt es durch die Zugabe von den Peptiden zu den Liposomen zu einer Porenbildung, kann die eingeschlossene NBD-Glucose aus den Liposomen herausdiffundieren, oder alternativ kann Dithionit in die Liposomen eindringen, wodurch die NBD-Fluoreszenz reduziert wird (Abbildung 3c). Die Zugabe der Verbindungen **1a**,

2 und **4** zu mit NBD-Glucose beladenen Liposomen führte zu einem vollständigen Verlust der Fluoreszenz (Abbildung 3d). Im Gegensatz dazu wurde nach Zugabe von Peptid **7** keine Reduktion beobachtet, was darauf hinweist, dass die Peptide **1a**, **2** und **4** die Porenbildung in Liposomen induzierten, während Peptid **7** keinen Effekt zeigte. Die oben genannten Erkenntnisse, d.h. die vollständige Hydrolyse von [^3H]PI durch PI-PLC und die Reduktion von NBD-Glucose durch Dithionit, könnten auch auf eine peptidinduzierte Lyse der Liposomen zurückzuführen sein. Elektronenmikroskopische Analysen ergaben jedoch, dass die Liposomen nach der Peptidbehandlung nicht von den Kontroll-Liposomen zu unterscheiden waren (Abbildung S3), was ausschließt, dass die Peptide als Detergenzien eine Lyse der Liposomen bewirkten.

Um die Leucinostatin-Aktivität bei lebenden Trypanosomen zu testen, wurden *T. b. brucei*-Blutformen 24 h lang mit Verbindung **2** behandelt, bevor die Parasiten mit dem vom mitochondrialen Membranpotenzial abhängigen Farbstoff MitoTracker inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden. Die typische mitochondriale Färbung der Kontroll-Trypanosomen fehlte bei den mit

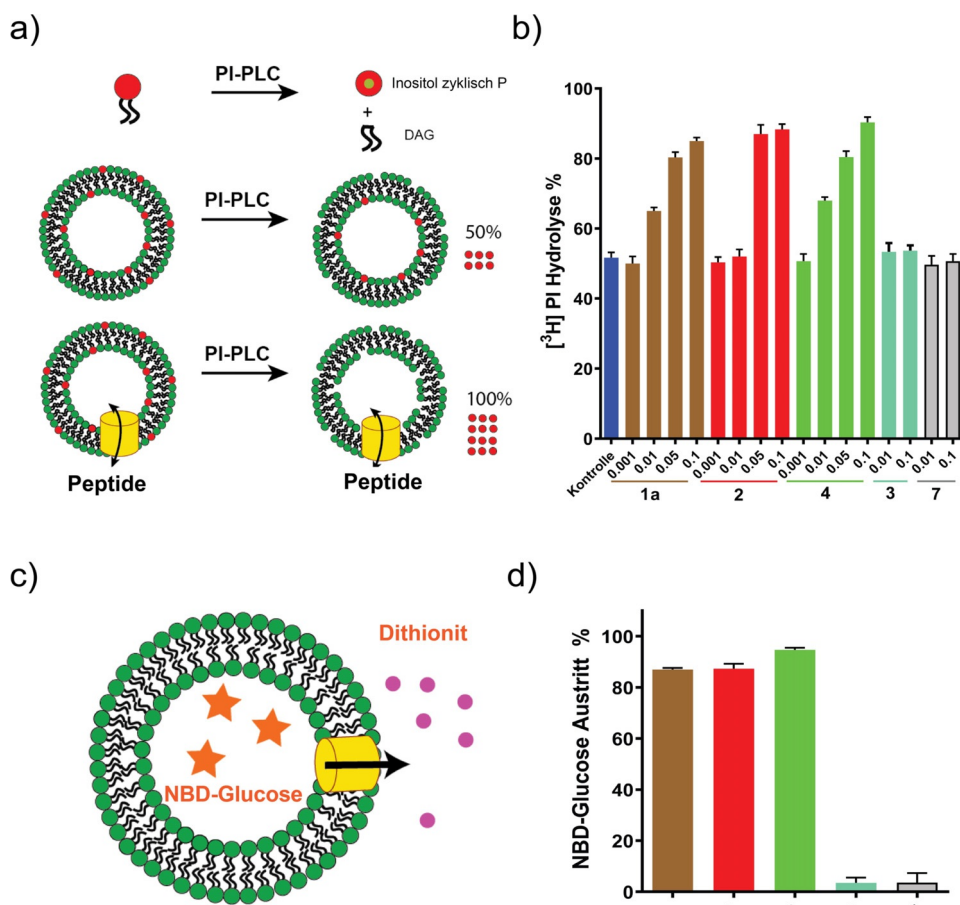


Abbildung 3. a) Schematische Darstellung des PI-PLC-Assays. Inkubation von unilamellaren Liposomen aus Ei-PC und Ei-PA (3:1, Molverhältnis; grüne Symbole) und Spuren von [^3H]PI (rote Symbole) mit PI-PLC führt zur Hydrolyse von [^3H]PI (zu zyklischem Inositolphosphat und Diacylglycerin (DAG)) in der äußeren Doppelmembranschicht, während [^3H]PI in der inneren Membran vor dem Enzym geschützt ist. Da sich [^3H]PI während der Herstellung der Liposomen gleichmäßig zwischen den beiden Membranen verteilt, wird erwartet, dass ungefähr 50 % durch PI-PLC hydrolysiert wird. In mit Peptiden rekonstituierten unilamellaren Liposomen wird [^3H]PI aus der inneren in die äußere Membranschicht verschoben, wo es für PI-PLC zugänglich wird. b) Die Durchmischungsaktivität der Peptide **1a**, **2**, **3**, **4** und **7** ist in Konzentrationsabhängigkeit mit einem Peptid-Phospholipidverhältnis zwischen 0.001 und 0.1 dargestellt. c) Schematische Darstellung des eingeschlossenen NBD-Glucose-Assays. Unilamellare Liposomen, die mit NBD-Glucose (orangefarbene Sterne) fixiert sind, werden mit Peptiden behandelt. Wenn bei der Peptidzugabe ein Leck auftritt, wird die NBD-markierte Glucose durch Dithionit (violette Symbole) gequenchet und die Abnahme des Fluoreszenzsignals gemessen. d) NBD-Glucose-Austritt durch Zugabe der Peptide **1a**, **2**, **3**, **4** und **7** bei einem Phospholipid-Peptid-Verhältnis (PPR) von 0.1.

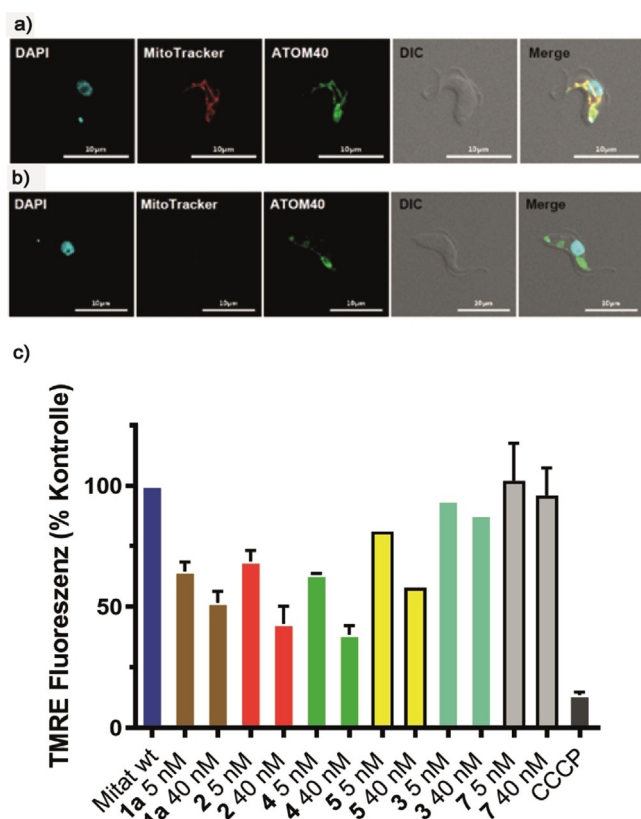


Abbildung 4. Qualitative und quantitative Immunfluoreszenzfärbung von NYsm-Parasiten. a) Unbehandelte NYsm-Parasiten wurden mit 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), MitoTracker und Anti-ATOM40 gefärbt. b) NYsm-Parasiten wurden einen Tag lang mit **2** behandelt und mit DAPI, MitoTracker und Anti-ATOM40 gefärbt. c) Die quantitative Messung des Mitochondrienmembranpotentials mit den Verbindungen **1a**, **2**, **3**, **4**, **5** und **7**. Die Positivkontrolle Carbonylcyanid m-Chlorphenylhydrazon (CCCP) ist ebenfalls gezeigt. DIC = differentieller Interferenzkontrast.

Verbindung **2** behandelten Parasiten vollständig (Abbildung 4a,b), was darauf hinweist, dass die Zugabe von Verbindung **2** zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führte. Ähnliche Ergebnisse wurden mit den Verbindungen **4** und **5** (40 nM Endkonzentration) erzielt. Im Gegensatz dazu wurden keine Veränderungen in der MitoTracker-Färbung beobachtet, wenn *T. brucei*-Blutformen mit den Verbindungen **3** und **7** behandelt wurden. Um diese Befunde zu untermauern, wurde das mitochondriale Membranpotential in den Parasiten vor und nach der Zugabe der Leucinostatin-Derivate mit dem mitochondrialen Membranpotential-Farbstoff TMRE quantifiziert. Die Behandlung der Trypanosomen mit den Verbindungen **1a**, **2**, **4** und **5** führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der TMRE-Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollparasiten (Abbildung 4c), was den wirkstoffinduzierten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials widerspiegelt. Im Gegensatz dazu wurden für die Verbindungen **3** und **7** keine Veränderungen der Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 4c).

Darüber hinaus zeigte die Untersuchung der wirkstoff-behandelten Trypanosomen mittels Transmissionselektronenmikroskopie Veränderungen in der mitochondrialen Ul-

trastruktur, wobei die mitochondriale Matrix eine reduzierte Elektronendichte aufwies, während andere intrazelluläre Strukturen unbeeinflusst schienen (Abbildung 5). Bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung der mit dem Wirkstoff behandelten Parasiten wurden keine Veränderungen festgestellt (Abbildung S4). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Verbindungen **1a**, **2**, **4** und **5** auf die Blutstromformen von *T. b. brucei* wirken, indem sie die mitochondriale Ultrastruktur beeinflussen und einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verursachen.

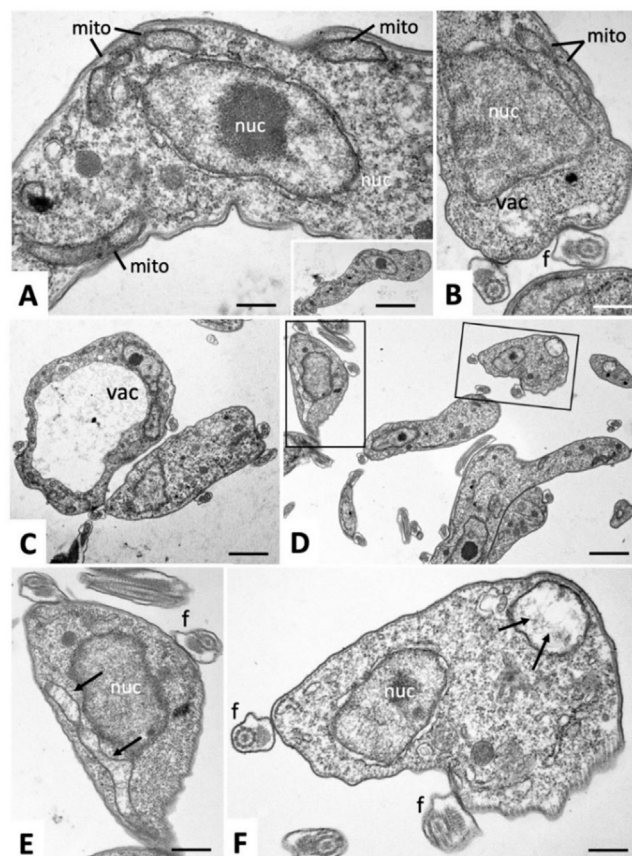


Abbildung 5. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (TEM) von *T. b. brucei* Blutstromformen. A zeigt eine stärker vergrößerte Ansicht des Zytoplasmas einer unbehandelten Kontrolle. Der Einschub zeigt die entsprechende niedriger vergrößerte Ansicht. Erkennbar sind Kern (nuc) und Teile des Mitochondriums mit einer elektronendichten Matrix. Balken in A = 0.25 μ m; Einschub = 1.2 μ m. B und C zeigen Parasiten, die mit 5 nM **4** für 2 h behandelt wurden. Das Mitochondrium (mito) behält eine elektronendichte Matrix, aber in vielen Fällen wiesen die Parasiten unterschiedliche Grade der Vakuolisierung (vac) auf. Balken in B = 0.35 μ m, C = 0.8 μ m. In D, E und F wurden die Parasiten mit 40 nM **4** für 2 h behandelt. D ist eine Übersicht mit geringer Vergrößerung, die umrahmten Bereiche sind in E und F vergrößert. Die sichtbaren Teile des Mitochondriums haben ihre charakteristische elektronendichte Matrix verloren (schwarze Pfeile in E, F) und erscheinen abgerundet und vergrößert (F). Die Ultrastruktur der Geißel (f) bleibt unverändert. Balken in D = 1.2 μ m; E = 0.45 μ m; F = 0.3 μ m.

In-vitro-Selektion auf Wirkstoffresistenz

Um mehr über den trypanoziden Wirkmechanismus zu erfahren, wurde versucht, resistente Mutanten zu selektieren. *T. b. brucei* des „New York single-marker“ Stammes (NYsm)^[26] wurde in vitro subletalen Konzentrationen (0.5 nM–1.5 nM) von **2** ausgesetzt. Die Kulturen wurden etabliert und schließlich in wirkstoffhaltigem Medium subpassagiert. Es gab jedoch keine Anzeichen für die Entwicklung einer Wirkstoffresistenz. Die Parasitenkulturen starben immer innerhalb weniger Tage ab, wenn sie 1.5 nM **2** ausgesetzt wurden, selbst nach 7 Monaten der Selektion. Dies könnte darauf hinweisen, dass **2** einen grundlegenden Prozess stört, der nicht ohne weiteres durch eine Mutation in einem einzelnen Gen überwunden werden kann. Nachdem es nicht gelungen war, durch Vorwärtsselektion resistente Trypanosomen zu erhalten, wurde ein reverser genetischer Ansatz angewendet, um auf Resistenz zu selektieren. Zu diesem Zweck wurde eine in *T. b. brucei* NYsm transfizierte RNAi-Bibliothek verwendet,^[27] die aus etwa 12'000 gepoolten Transfektanten bestand, welche jeweils eine andere small interfering RNA (siRNA) unter der Kontrolle eines Tetracyclin-Promotors exprimierten. Dieser Ansatz ist leistungsstark für die Selektion von Mutanten mit Funktionsverlust, die eine Wirkstoffresistenz aufweisen, wenn die Expression eines bestimmten Gens herunterreguliert wird.^[27] Es wurden jedoch nach Induktion der siRNA-Expression durch Zugabe von 1 µg mL⁻¹ Tetracyclin und anschließender Selektion mit **2** bei 8.6, 17.1 oder 25.7 nM keine resistenten Zellen erhalten. Eflornithin wurde als Positivkontrolle für die Wirkstoffselektion verwendet und führte zur Identifizierung des Aminosäuretransporters TbAAT6, wie zuvor gezeigt.^[27]

In vitro pharmakodynamische Parameter

Isotherme Mikrokolorimetrie^[28,29] wurde mit den beiden Leitverbindungen **2** und **4** durchgeführt, um deren trypanozide Wirkung in Echtzeit zu überwachen (Abbildung S5). Die beiden Verbindungen wurden bei dem ein- bis dreißigfachen ihrer EC₅₀ untersucht (1 bis 30 nM für **2**; 0.5 bis 15 nM für **4**).

Für beide Moleküle wurde eine dosisabhängige Wachstumshemmung beobachtet, d. h. für **2** bei 3 nM und für **4** bei 1.5 nM, und sie reduzierten das Wachstum der Blutstromform von *T. b. rhodesiense* erheblich, töteten aber nicht alle Parasiten. Bei 5 nM **4** oder 10 nM **2** wurden die Parasiten innerhalb von 24 Stunden abgetötet

Tabelle 2: Isotherme Kalorimetrie-Messungen mit einer Dosis-Wirkungs-Messung von **2** und **4**. Mit zunehmender Inhibitorkonzentration wurden die Zeiten bis zum Peak und die Zeiten bis zur Abtötung verkürzt.

Substanz	Konz. [nM]	Beginn Wirkstoffwirkung [h]	Zeit zum Peak [h]	Zeit zum Abtöten [h]
Kein Wirkstoff			38.3 ± 0.8	108 ± 1
2	1.0	2.2 ± 0.7	39.9 ± 0.8	115 ± 5
	3.0	3.3 ± 2.6	35.3 ± 4.2	101 ± 15
	10	< 2	12.8 ± 1.1	27 ± 2.6
	30	< 2	15.2 ± 1.5	31 ± 3.3
4	0.5	5.5 ± 6	40 ± 2.5	112 ± 6
	1.5	4.2 ± 2.1	33.5 ± 3.2	97 ± 13
	5.0	< 2	10.8 ± 1.3	23 ± 0.9
	15	< 2	13.7 ± 2.3	28 ± 3.5

(Tabelle 2). Die Zeit bis zur Abtötung war ebenfalls dosisabhängig. Der Wirkungseintritt war bei beiden Leucinostatin-Derivaten sehr schnell (Tabelle 2).

Wirksamkeit gegen weitere protozoische Parasiten

Ermutigt durch die hohe Aktivität von Leucinostatin A und seinen Derivaten gegen *T. brucei*, wurden die Leitverbindungen **2** und **4** sowie die weiteren Verbindungen **3**, **5** und **7** auch gegen die Protozoen *Trypanosoma cruzi* (Erreger der Chagas-Krankheit), *Leishmania donovani* (viszerale Leis-

Tabelle 3: Aktivitäten von Leucinostatin A (**1a**), **2-5** und **7** auf verschiedene Parasitenstämme einschließlich der positiven Kontrollsubstanzen (Miltefosin, Benznidazol und Chloroquin).

Verbindung	<i>L. donovani</i> . axenisch Amastigoten [nM]	<i>L. donovani</i> . Macrophagen [nM]	<i>T. cruzi</i> [nM]	<i>P. falciparum</i> NF54 [nM]
1a	1.05 ^[b] (0.96–1.15)	9.8 ^[a] (5.0–19)	23 ^[c] (16–33)	0.61 ^[c] (0.27–1.40)
2	11 ^[c] (9.1–14)	18 ^[c] (7.4–42)	193 ^[f] (145–258)	4.8 ^[e] (3.9–5.7)
3	9259 ^[b] (6201–13820)	ND	> 2000 ^[b]	591 ^[b] (535–654)
4	4.9 ^[c] (3.1–7.9)	50 (39–64) ^[b]	114 ^[d] (92–142)	5.4 ^[d] (4.3–6.6)
5	4.8 ^[b] (3.3–7.1)	ND	311 (190–510) ^[b]	26 ^[b] (22–30)
7	> 8565 ^[b]	ND	> 2000 ^[b]	> 8565 ^[b]
Miltefosin	483 ^[d] (402–580)	4912 ^[d] (3415–7065)	ND	ND
Benznidazol	ND	ND	1925 ^[d] (1522–2435)	ND
Chloroquin	ND	ND	ND	4.9 ^[d] (3.8–6.2)

ND = nicht bestimmt; [a] n = 1; [b] n = 2; [c] n = 3; [d] n = 4; [e] n = 6; [f] n = 8.

hmaniose) und *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica) getestet (Tabelle 3).

Die IC₅₀-Werte lagen im nM-Bereich, mit Ausnahme von **3** und **7** (Tabelle 3), und entsprachen damit den Ergebnissen, die im *T. brucei*-Assay gemessen wurden. Niedrige nM-IC₅₀-Werte wurden gegen die axenisch gewachsenen Amastigoten von *L. donovani* beobachtet. Die IC₅₀-Werte von **2** und **4** auf intrazelluläre *L. donovani* betrugen 18 nM bzw. 50 nM, was darauf hindeutet, dass die Verbindungen ausgezeichnete zellpenetrierende Eigenschaften besitzen. Dies wurde bei intrazellulären *T. cruzi*-Parasiten bestätigt. Intra-erythrozytäre *P. falciparum* wurde ebenfalls durch **2** und **4** bei 4.8 nM bzw. 5.4 nM gehemmt.

Schlussfolgerung

Die Entwicklung von Peptiden als Wirkstoffkandidaten stellt im Vergleich zu kleinen Molekülen einige zusätzliche Herausforderungen dar, was ihre breite Verwendung bisher eingeschränkt hat. Ein Aspekt ist die inhärente biologische Instabilität von xenobiotischen Peptiden und ihr schneller enzymatischer Abbau im Körper, der die Exposition begrenzt. Nichtsdestotrotz stehen Peptidtherapeutika aufgrund ihrer ausgeprägten biologischen Aktivitäten sowohl in der akademischen Welt als auch in der Industrie weiterhin im Fokus aktueller Wirkstoffforschungs- und Wirkstoffentwicklungsprojekte und zeigen steigende Erfolgsraten.^[30]

Frühere Berichte zeigten, dass Leucinostatin A sowohl bei oraler als auch bei intravenöser Verabreichung toxisch war.^[12,31] Synthetische Modifikationen des Naturstoffs Leucinostatin A ergaben durch Entfernung des Michael-Akzeptors und Substitution der AHMOD-Seitenkette entweder durch *n*-Octyl- oder Ethyl-cyclohexyl äquipotente Verbindungen. Die Verbindungen **2** und **4** hemmten das Wachstum von protozoischen Parasiten im tiefen nanomolaren Bereich und zerstörten künstliche Liposomen im gleichen Konzentrationsbereich, ohne sie aufzulösen, zu desintegrieren oder zu lysieren. Die Inhibitoren ließen die Phospholipide von einer Hälfte der Membrandoppelschicht in die andere flippen. Interessanterweise blieben die *T. brucei*-Parasiten strukturell intakt, verloren aber die Funktionalität bestimmter Membransysteme, vor allem der inneren Mitochondrienmembran.

Die Leucinostatin-Derivate wiesen die gleiche SAR gegen Trypanosomen und Liposomen auf. Es wurde in dieser Studie herausgearbeitet, dass die α -helikale Natur der Verbindung, die Protonierung des terminalen Amins und die Hydrophobizität der Seitenkette in beiden Testsystemen essentiell sind, was auf das gleiche Wirkprinzip in beiden Systemen hinweist. Der schnelle Wirkungseintritt, gemessen durch isotherme Mikrokalanometrie, unterstützt diese Schlussfolgerung.

Die Destabilisierung der inneren Mitochondrienmembran stellt einen Wirkmechanismus dar, der die Zellen auf einer sehr fundamentalen Ebene außer Gefecht setzt und gegen den sie nicht ohne weiteres eine Resistenz entwickeln können. Dies wurde gezeigt, indem *T. brucei* sieben Monate lang subletalen Dosen von **2** ausgesetzt wurde, sowie durch

ein Screening gegen 12'000 siRNA-Knockdown-Mutanten, wobei keine Resistenz entwickelte wurde.

Im Vergleich zu den klinisch zugelassenen Medikamenten Melarsoprol, Pentamidin und Suramin sind die Verbindungen **2** (ZHAWOC6025) und **4** (ZHAWOC6027) potenter gegen *T. brucei* und, was vielleicht noch wichtiger ist, zeigten keine Anzeichen für die Entwicklung einer Wirkstoffresistenz. Die Stoffe **2** und **4** stellen eine neue Verbindungsklasse für die Behandlung von *T. brucei*-Infektionen dar und sollten auch für die Anwendung gegen andere parasitäre Erkrankungen in Betracht gezogen werden.

Danksagung

Wir bedanken uns für die großzügige und kontinuierliche finanzielle Unterstützung durch die Schweizerische Agentur für Technologie und Innovation (KTI) und Innosuisse (Forschungsförderung 16445.1 PFLS-LS, 19208.1 PFPL-LS und 34227.1 IP-LS an R. Riedl und das Medizinalchemie-Team der ZHAW). A. Hemphill wurde vom Schweizerischen Nationalfonds (SNF) mit der Forschungsförderung 310030_184662 und P. Bütikofer vom SNF mit der Forschungsförderung 31003A_169355 unterstützt. L. Wang erhielt finanzielle Unterstützung durch das Stipendium Nr. 881 der Velux Stiftung (an P. Bütikofer und Anant K. Menon). Wir bedanken uns bei Isabel Roditi (Institut für Zellbiologie, Universität Bern) für die Bereitstellung der RNAi-Bibliothek. Wir danken M. Cal, R. Rocchetti und S. Keller-Märki für die Hilfe bei der Testung gegen Parasiten. Wir danken auch Aitor Moreno und Sandra Loss (Bruker Schweiz AG, Fällanden) für NOE-Messungen am 800-MHz-NMR-Instrument.

Interessenkonflikt

M. Adams ist derzeit CEO der Bacoba AG, die diese Forschung wissenschaftlich, finanziell und logistisch unterstützt hat. Die Verwendung dieser Verbindungen ist durch das Patent EP3345917 geschützt.

Stichwörter: antiparasitäre Inhibitoren · Medizinalchemie · Peptide · Wirkprinzip · Wirkstoffforschung

- [1] T. Arai, Y. Mikami, K. Fukushima, T. Utsumi, K. Yazawa, *J. Antibiot.* **1973**, 26, 157–161.
- [2] Y. Mori, M. Tsuboi, M. Suzuki, K. Fukushima, T. Arai, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 94–96.
- [3] Y. Mori, M. Suzuki, K. Fukushima, T. Arai, *J. Antibiot.* **1983**, 36, 1084–1086.
- [4] S. Cerrini, D. Lamba, A. Scatturin, G. Ughetto, *Biopolymers* **1989**, 28, 409–420.
- [5] A. Isogai, J. Nakayama, S. Takayama, A. Kusai, A. Suzuki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, 56, 1079–1085.
- [6] A. F. C. Martinez, L. A. B. Moraes, *J. Antibiot.* **2015**, 68, 178–184.
- [7] H. Abe, H. Ouchi, C. Sakashita, M. Kawada, T. Watanabe, M. Shibasaki, *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 11792–11796.

- [8] G. Wang, Z. Liu, R. Lin, E. Li, Z. Mao, J. Ling, Y. Yang, W.-B. Yin, B. Xie, *PLOS Pathog.* **2016**, *12*, e1005685.
- [9] Y. Mikami, K. Fukushima, T. Arai, F. Abe, H. Shibuya, Y. Ommura, *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. Abt. 1 Orig. A* **1984**, *257*, 275–283.
- [10] M. Ricci, P. Sassi, C. Nastruzzi, C. Róssi, *AAPS PharmSciTech* **2000**, *1*, 9–19.
- [11] K. Otoguro, H. Ui, A. Ishiyama, N. Arai, M. Kobayashi, Y. Takahashi, R. Masuma, K. Shiomi, H. Yamada, S. Omura, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 322–324.
- [12] A. Ishiyama, K. Otoguro, M. Iwatsuki, M. Iwatsuki, M. Namatame, A. Nishihara, K. Nonaka, Y. Kinoshita, Y. Takahashi, R. Masuma, K. Shiomi, H. Yamada, S. Omura, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 303–308.
- [13] K. Ishiguro, T. Arai, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1976**, *9*, 893–898.
- [14] P. Csermely, L. Radics, C. Rossi, M. Szamel, M. Ricci, K. Mihály, J. Somogyi, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1994**, *1221*, 125–132.
- [15] M. Fresta, M. Ricci, C. Rossi, P. M. Furneri, G. Puglisi, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *226*, 222–230.
- [16] K. R. Sridhar, *Frontiers in Fungal Ecology, Diversity and Metabolites*, I.K. International Pvt Ltd, Dehli, **2008**.
- [17] G. R. Marshall, E. E. Hodgkin, D. A. Langs, G. D. Smith, J. Zabrocki, M. T. Leplawy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 487–491.
- [18] L. A. Stubbing, I. Kavianinia, M. A. Brimble, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3542–3549.
- [19] G. Vertuani, M. Boggian, A. Scatturin, M. Ricci, B. Meli Balbocchino, L. Tuttobello, C. Rossi, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 254–260.
- [20] H. Abe, M. Kawada, C. Sakashita, T. Watanabe, M. Shibasaki, *Tetrahedron* **2018**, *74*, 5129–5137.
- [21] I. Momose, T. Onodera, H. Doi, H. Adachi, M. Iijima, Y. Yamazaki, R. Sawa, Y. Kubota, M. Igarashi, M. Kawada, *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 1120–1127.
- [22] M. Morgenthaler, E. Schweizer, A. Hoffmann-Röder, F. Benini, R. E. Martin, G. Jaeschke, B. Wagner, H. Fischer, S. Bendels, D. Zimmerli, J. Schneider, F. Diederich, M. Kansy, K. Müller, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1100–1115.
- [23] A. Marquette, B. Bechinger, *Biomolecules* **2018**, *8*, 18.
- [24] M. Hasan, M. M. R. Moghal, S. K. Saha, M. Yamazaki, *Biophys. Rev.* **2019**, *11*, 431–448.
- [25] L. Wang, Y. Iwasaki, K. K. Andra, K. Pandey, A. K. Menon, P. Bütikofer, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 18318–18327.
- [26] E. Wirtz, S. Leal, C. Ochatt, G. A. Cross, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, *99*, 89–101.
- [27] G. Schumann Burkard, P. Jutzi, I. Roditi, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2011**, *175*, 91–94.
- [28] T. Wenzler, A. Steinhuber, S. Wittlin, C. Scheurer, R. Brun, A. Trampuz, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1668.
- [29] M. Gysin, O. Braissant, K. Gillingwater, R. Brun, P. Mäser, T. Wenzler, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2018**, *8*, 159–164.
- [30] A. T. Zizzari, D. Pliatsika, F. M. Gall, T. Fischer, R. Riedl, *Drug Discov. Today* **2021**, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.020>.
- [31] Y. Mikami, K. Fukushima, T. Arai, F. Abe, H. Shibuya, Y. Ommura, *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. Ser. A* **1984**, *257*, 275–283.

Manuskript erhalten: 10. Februar 2021
Veränderte Fassung erhalten: 13. März 2021
Akzeptierte Fassung online: 17. März 2021
Endgültige Fassung online: 10. Mai 2021